



(11)
(21)
(22)
(43)

Offenlegungsschrift 29 15 082

Aktenzeichen: P 29 15 082.1
Anmeldetag: 12. 4. 79
Offenlegungstag: 31. 10. 79

(30) Unionspriorität:
 13. 4. 78 Frankreich 7810975

(54) Bezeichnung: Verfahren und Reagensatz zum Nachweis und zur Charakterisierung von Nukleinsäuren und ihren Sequenzen

(71) Anmelder: Institut Pasteur, Paris

(74) Vertreter: Vossius, V., Dipl.-Chem. Dr. rer.nat.; Vossius, D., Dipl.-Chem.; Hiltl, E., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Tauchner, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Heunemann, D., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000 München

(72) Erfinder: Kourilsky, Philippe; Avrameas, Stratis, Cami geb. Contamine, Brigitte; Guesdon, Jean-Luc; Paris

VOSSIUS · VOSSIUS · HILTL · TAUCHNER · HEUNEMANN
PATENTANWÄLTE

2915082

SIEBERTSTRASSE 4 · 8000 MÜNCHEN 86 · PHONE: (089) 474075
CABLE: BENZOLPATENT MÜNCHEN · TELEX 5-29453 VOPATO

5

u.Z.: P 108 (DV/nk/ke)
Case: PL-0053 79 05

12. April 1979

Institut Pasteur
10 Paris, Frankreich

Verfahren und Reagensatz zum Nachweis und zur Charakterisierung
von Nukleinsäuren und ihren Sequenzen

15

Priorität: 13. April 1978, Frankreich, Nr. 78 10975

20

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis und zur Charakterisierung einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz oder eines bestimmten Nukleinsäure-Fragments, insbesondere eines Gens, auch der gesamten Nukleinsäure in einer Probe eines Nukleinsäurekomplexes durch Zusammenbringen der Probe, gegebenenfalls nach vorherigem Denaturieren der untersuchten Nukleinsäure, mit einem eine komplementäre Nukleinsäure enthaltenden Indikator, der hybridisierbar mit der gesuchten Nukleinsäure oder deren Sequenz ist, dadurch gekennzeichnet, daß man als Indikator einen durch Bindung an ein Enzym vor oder nach der Hybridisierungsreaktion chemisch modifizierten Indikator verwendet wobei die gegebenenfalls anwesende Nukleinsäure oder deren Sequenz durch die Aktivität des so umgewandelten Hybridisierungsprodukts aus Indikator und Nukleinsäure oder deren Sequenz als Substrat für ein Enzym nachgewiesen werden kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

909844/0747

2915082

- 1 man das Enzym im Hinblick auf seine Fähigkeit, auf ein farbiges Substrat einzuwirken, auswählt, und daß man die Umwandlungsrate des Substrats, die dem Anteil der gesuchten Nukleinsäure oder deren Sequenz in der Ausgangsprobe korrelierbar ist,
- 5 durch optische oder analoge Analyse bestimmt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man den Indikator durch eine chemische Gruppe modifiziert, die mit dem Enzym oder einem Molekül, das stabil mit dem Enzym verbunden ist, einen stabilen Komplex bilden kann.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man sowohl als chemische Gruppe als auch als Molekül Biotin oder Avidin verwendet.

15

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als Enzym die β -Galactosidase verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst die Hybridisierung, dann die Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym durchführt und anschließend den gegebenenfalls im Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikator abtrennt bzw. abbaut.

25

7. Verfahren nach Anspruch 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man zunächst die Hybridisierung und anschließend nach Abtrennung bzw. Abbau des gegebenenfalls im Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikators die Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym durchführt.

8. Reagensatz zur Durchführung des Verfahrens gemäß Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß er folgende Bestandteile aufweist:

35 a) mindestens einen bestimmten Indikator aus einer RNA oder einer einzelsträngigen DNA, die charakteristisch ist für eine gesuchte Nukleinsäure oder deren Sequenz, wobei dieser Indikator im Hinblick auf seine Bindung mit einem

909844/0767

- 1 Enzym chemisch modifiziert ist,
- b) das gegebenenfalls modifizierte Enzym, das für die Bindung mit dem Indikator verwendet wird,
- 5 c) ein insbesondere farbiges Substrat, das für das Enzym spezifisch ist,
- d) Reagentien, die für die Zellyse, insbesondere bei der Untersuchung von Blut, und für die Extraktion von Nukleinsäuren erforderlich sind.
- 10
9. Reagensatz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Indikator aus einer RNA an Biotin gebunden ist und daß das Kupplungsprodukt aus Avidin und einem Enzym die β -Galactosidase als Enzym enthält.
- 15
10. Komplex aus einem Enzym, das insbesondere durch seine Fähigkeit mit einem farbigen Substrat zu reagieren nachweisbar ist, und einem RNA- oder DNA-Indikator, wobei die Bindung direkt oder mittels eines komplexbildenden Mittels erfolgt.
- 20
11. Komplex aus einem Enzym, das insbesondere durch seine Fähigkeit mit einem farbigen Substrat zu reagieren nachweisbar ist, und mindestens einem chemischen Molekül, wobei der ganze Komplex an einen gegebenenfalls modifizierten RNA- oder DNA-Indikator gebunden werden kann.
- 25
- 30 12. Komplex nach Anspruch 11 enthaltend β -Galactosidase als Enzym und Avidin oder Biotin als chemische Substanz.

1

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und gegebenenfalls zur Charakterisierung einer Nukleinsäure oder einer Sequenz derselben, in einer diese möglicherweise enthaltenden Probe. Sie betrifft ferner die zur Durchführung des Verfahrens erforderlichen Reagenzien und schließlich die Verwendung eines solchen Verfahrens, beispielsweise zur raschen Diagnostizierung in vitro, ob in einer biologischen Probe menschlicher oder tierischer Herkunft bestimmte Nukleinsäurepartikel etwa infektiösen Charakters vorhanden sind oder ob ein bestimmtes Gen aus dem normalen Erbgut des Wirts unverändert ist oder nicht.

Jede biologische Probe, beispielsweise Blut, das jedem Lebewesen entnommen werden kann, enthält verschiedene Nukleinsäuren in außerordentlicher Reichhaltigkeit. Dies trifft auch für verschiedene Sequenzen zu, beispielsweise zahlreiche Gene, die jede einzelne Nukleinsäure in diesen Proben enthalten kann. Daher kann der Genetiker auf große Schwierigkeiten beim Aufspüren oder bei der Charakterisierung von bestimmten Nukleinsäuren in einer Probe stoßen. Die Schwierigkeiten werden noch größer, wenn es darum geht, die Anwesenheit bestimmter Fragmente, beispielsweise der in diesen Nukleinsäuren enthaltenen Gene, zu charakterisieren.

Um eine einzelne Nukleinsäure oder einzelne Gene - beispielsweise im Hinblick auf Studien der Organisation genetischer Sequenzen der DNA, in der sie enthalten sind - zu charakterisieren, benötigt man zunächst eine mit dieser Nukleinsäure angereicherte, aus der untersuchten Probe erhaltene Fraktion. Zu diesem Zweck wurden bereits Anreicherungsmethoden vorschlagen, die sich die Hybridisierungsreaktionen zwischen der gesuchten Nukleinsäure bzw. dem Gen und einem Indikator zunutze machen, sofern ein solcher Indikator verfügbar ist und

- 1 die erhaltenen Hybride sodann von der Probe abgetrennt werden können, beispielsweise durch differentielle Sedimentation aus einer Lösung mittels Ultrazentrifugieren.
- 5 Solche Indikatoren wurden bereits beschrieben: es handelt sich dabei im allgemeinen um Ribonukleinsäuren (RNA), beispielsweise solche, die mittels genetischer Transkription von Strukturgenen erhalten wurden. Die Strukturgenen sind Bestandteile der DNA der einzelligen Zellorganismen, aus denen sie stammen. Die DNA ist demnach ge-
10 eignet, ihrerseits in die Proteine, für welche die Struktur- gene codieren, "übersetzt" zu werden. Es ist bekannt, daß die RNA-Nukleotid-Sequenzen zu der Sequenz der DNA, von der sie abstammen, komplementär sind. Dies zeigt sich
15 in der Eigenschaft der RNA, gemischte Hybride mit den entspre- chenden Sequenzen der zugehörigen DNA zu bilden, die zuvor denaturiert worden ist, soweit diese anfangs doppelsträngig war, beispielsweise nach Inkubation bei hoher Ionenstärke und erhöhter Temperatur oder in basischem Milieu.
- 20 Es wurde vorgeschlagen, den Nachweis von gebildeten Hybriden mit Hilfe einer radioaktiven Markierung der Gene selbst oder der RNA-Indikatoren vorzunehmen. Die Durchführung dieser Me- thoden ist jedoch nicht einfach, und außerdem ist es dabei nicht immer möglich, die Gene innerhalb der DNA ausreichend
25 zu lokalisieren.

Um die untersuchten Gene in der sie enthaltenden DNA besser lokalisieren zu können und eine Methode zur Bildung von mit bestimmten DNA-Segmenten angereicherten Fraktionen - aus-
30 gehend von derselben DNA - zu entwickeln, haben Manning et al eine Methode zum physiko-chemischen Nachweis dieser Gene vor- geschlagen. Diese Methode besteht aus der chemischen Modifi- zierung des RNA-Indikators durch Anheftung von Biotingruppen, d.h. Derivaten des Cytochrom C. Diese Biotingruppen heften
35 sich durch Brückenbildung bei der Hybridisierung an die DNA an und sind nun physikalisch im Elektronenmikroskop als Staubteilchen, die aus submikroskopischen Kugelchen von

1 einem Durchmesser von 60 nm bestehen, insbesondere auf einem Untergrund von Polymethacrylsäureester nachweisbar. Die Kugelchen wurden zuvor chemisch modifiziert und kovalent an Avidin-Moleküle gebunden. Diese Methode ist in "A New Method of in situ Hybridization",
5 Chromosoma, Springer Verlag (Berlin), Bd. 53 (1975), S. 107 bis 117 und in "A Method for Gene Enrichment Based on the Avidin-Biotin Interaction, Application to the Drosophila Ribosomal RNA Genes", Biochemistry, Bd. 16 (1977), Nr. 7, S. 1364 - 1369 beschrieben.

10

Die Inkubation der Hybride, die durch Biotin und Avidin modifiziert sind, macht es möglich, die Stelle der gesuchten Gene in der sie enthaltenden DNA zu "markieren" und sie innerhalb der globulären Struktur der DNA nachzuweisen. Diese ist ebenfalls 15 im Elektronenmikroskop sichtbar infolge der sehr starken nicht kovalenten Interaktionen, die nach wie vor an den Stellen herrschen, die frei von Biotin und Avidin geblieben sind.

Diese Methode ist jedoch kaum dazu geeignet,
20 rasch zu bestimmen, ob derartige Gene bzw. DNA in einer biologischen Probe menschlicher oder tierischer Herkunft anwesend sind oder nicht. So ist beispielsweise eine rasche Diagnose einer Infektion, von welcher der Wirt möglicherweise befallen ist, oder der Tatsache, ob ein Gen oder beispielsweise eine DNA-Sequenz
25 in diesem Wirt unverändert geblieben ist oder nicht nach der Methode schwer möglich

Aufgabe der Erfindung ist es Nachweis- und sogar Charakterisierungsmethoden zur Verfügung zu stellen, die mit einfachen Mitteln von Laboranten ohne besondere Ausbildung angewandt werden können.
30 Diese Aufgabe wird durch die Erfindung gelöst.

Die Erfindung betrifft somit den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand.

35 Natürlich darf die chemische Modifizierung die gegebenenfalls zusätzlich stattfindende Hybridisierung des Indikators mit der gesuchten DNA-Sequenz bzw. dem DNA-Fragment nicht behindern.

- 1 Für den Fachmann liegt es auf der Hand, daß mit dieser Methode die Möglichkeit gegeben ist, rasch festzustellen, ob in einer biologischen Probe das DNA-Gen bzw. DNA-Fragment, das dem verwendeten Indikator entspricht, vorhanden ist oder nicht, und
 - 5 dies sogar bei Anwesenheit einer großen Anzahl anderer Nukleinsäuren. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, daß durch den Nachweis aufgrund der enzymatischen Aktivität, wobei das Enzym durch das Substrat an das Hybrid gebunden ist, umfassende Anwendungsmöglichkeiten gegeben sind.
 - 10 Nach einer ausreichenden Reinigung des Hybrids ist es sogar möglich, Angaben über die Konzentration der gesuchten DNA in der untersuchten biologischen Probe bzw. über die Anzahl der Kopien des gesuchten Gens in der gereinigten DNA zu erhalten, und zwar durch Bestimmung der Enzymaktivität.
 - 15 Bei einer zu untersuchenden Nukleinsäureprobe kann man zunächst die Hybridisierung durchführen. Dann kann die Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym stattfinden. Man kann vor Bestimmung der
 - 20 Enzymaktivität den gegebenenfalls im Überschuß vorhandenen nicht hybridisierten Indikator bzw. das Überschüssige mit dem Indikator nicht umgesetzte Enzym abtrennen oder abbauen.
- Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Abtrennung oder der Abbau des Überschüssigen nicht hybridisierten Indikators gegebenenfalls vor der Bindung zwischen dem chemisch modifizierten und hybridisierten Indikator und dem Enzym erfolgen.
- 30 Der spezifische Indikator kann aus RNA oder einzelsträngiger DNA bestehen. Verwendet man eine ursprünglich doppelsträngige DNA (oder RNA) als Indikator, so muß er vorher durch an sich bekannte Methoden denaturiert worden sein.
 - 35 Führt man eine chemische Modifizierung des Indikators mit Biotin durch, so kann man die Methode nach Manning et al (a.a.O.)

1 mittels des Cytochrom C (durchschnittlich ein Molekül Biotin pro etwa 100 Nukleotide), anwenden.

Vorzugsweise verwendet man zum Markieren des Hybrids durch
5 das Enzym den Komplex, ^(Kupplungsprodukt) der sich nach der Methode von Avrameas (beschrieben in Immunochemistry, Bd. 6 (1969), S. 43 - 52) aus Avidin und den Enzym, insbesondere der β -Galactosidase, ergibt,

Man kann natürlich auch andere chemische Modifizierungsmethoden
10 für den Indikator und gegebenenfalls das Enzym im Hinblick auf deren Bindung, vorzugsweise nach der Hybridisierungsreaktion, verwenden und kann die modifizierenden Mittel für Indikator und Enzym umgekehrt verwenden.

15 Es kommen noch andere Paare von modifizierenden Mitteln für Indikator und Enzym in Frage, für die nachstehend einige Beispiele angegeben sind. Das erste dieser Mittel wird vorzugsweise jeweils zur chemischen Modifizierung des Indikators und das zweite zur chemischen Modifizierung des Enzyms eingesetzt.

20 Der Indikator kann beispielsweise nach einer bekannten Methode durch Metallionen, wie Quecksilberionen, modifiziert werden, und der Nachweis wird mittels eines Enzyms durchgeführt, das Sulfhydrylgruppen (-SH) aufweist oder an einen solchen Gruppen enthaltenden Träger gebunden ist.

25

Man kann beispielsweise folgendermaßen vorgehen, wenn die zu untersuchende Probe nur aus wenigen Millilitern Blut besteht: Die Erythrocyten werden lysiert, und die DNA wird nach üblichen Methoden extrahiert. Sodann wird eine kleine Menge der erhaltenen DNA, beispielsweise 1 bis 100 μ g, mit 0,1 - 0,3 N NaOH denaturiert, die Lösung anschließend neutralisiert und auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Die erhaltene Lösung wird mit dem der gesuchten DNA oder dem DNA-Fragment entsprechenden Indikator versetzt, und zwar etwa 35 1 μ g Indikator pro 100 μ g denaturierte DNA (die Menge der gebrauchten NaOH richtet sich nach dem Anteil der gesuchten DNA in der zu analysierenden

1 Probe). Die Lösung wird sodann mit Salzen versetzt, um ein hohes Ionenmilieu zu erreichen, nämlich mit mindestens 0,3 in Gegenwart von 50 % Formamid und eines Chelatbildners in geringer Konzentration. Das Volumen soll vorzugsweise gering sein.
5 Die Hybridisierung kann sodann bei der hierfür üblichen Temperatur 1 bis 40 Stunden (normalerweise 16 Stunden) durchgeführt werden. Man kann auch die Methode nach Manning (a.a.O.) oder andere Hybridisierungsmethoden anwenden, beispielsweise die Methode nach Kohne et al (Biochemistry, Bd. 16 (1977), S. 5329
10 - 5341), die bei der hierfür üblichen Temperatur in einer phenolhaltigen Emulsion durchgeführt wird.

Anschließend wird an ein Enzym, beispielsweise die β -Galactosidase, gebundenes Avicin zugesetzt, und zwar unter Bedingungen, welche die Bindung des Biotins am Indikator an die freien Gruppen des Avidins des Komplexes ermöglichen.
15

Der nicht hybridisierte Indikator wird anschließend vom hybridisierten Indikator nach üblichen Methoden abgetrennt, beispielsweise durch Ausfällen mit Polyäthylenglykol, Gelchromatographie beispielsweise mit Sepharose, oder Ultrazentrifugieren.

20 Andererseits kann der nicht hybridisierte Indikator vor der Bindung des Avidins, welches das Enzym mit den an den hybridisierten Indikator gebundenen Biotingruppen trägt, an die DNA abgetrennt werden.

Man kann das gegebenenfalls fixierte Enzym und dementsprechend 25 die gegebenenfalls stattfindende effektive Hybridisierung des Indikators mit der untersuchten DNA nachweisen, indem man ein Enzymsubstrat, insbesondere Orthonitrophenolgalactosid (ONPG), mit der Lösung in Berührung bringt.

Sobald die Versuchsbedingungen festgelegt sind, ist es natürlich 30 möglich, eine meßbare Aktivitätsschwelle zu bestimmen, beispielsweise durch eine kolorimetrische oder fluorographische Methode. Oberhalb dieser Schwelle kann auf die Anwesenheit der gesuchten DNA oder des DNA-Fragments in der behandelten Probe geschlossen werden.

35

Das nachstehend beschriebene im Labor durchgeführte Versuchsbei-

1 spiel dient zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.
Es liegt im Rahmen des handwerklichen Könnens, die Methoden
im Hinblick auf die untersuchte biologische Probe und die ge-
suchte DNA oder das DNA-Fragment entsprechend abzuwandeln.

5

Versuchsbeispiel

Der Versuch dient dem Nachweis einer Maus-DNA durch Hybri-
disierung dieser DNA mit ribosomaler Maus-RNA als Indikator.
100 µg Maus-DNA pro 100 µl wäßrige Lösung werden durch Ver-
10 setzen mit 10 µl 1 M NaOH denaturiert. Nach 10 Minuten wird
die Lösung mit 10 µl 1,5 M Natriumphosphorsäure (NaH_2PO_4) ver-
setzt und auf einen neutralen pH-Wert eingestellt. Die dena-
turierte DNA-Lösung wird sodann mit 1 µg. ribosomaler RNA, die
15 mit Biotin mittels Cytochrom C (hergestellt nach der Methode
von Manning et al.) markiert ist, versetzt. Das Volumen wird
mit Wasser auf 160 µl gebracht. Dann werden 40 µl einer Mine-
ralsalzlösung in einer Konzentration von 20 x SSC (Standard
Saline Citrate) und 200 µl redestilliertes oder deionisiertes
Formamid zugegeben. Die Lösung 1 x SSC ist eine wäßrige Lösung
20 von 0,15 M NaCl und 0,015M Natriumcitrat, bei einem pH-Wert von
7,0. Das Gemisch wird 16 Stunden bei üblicher Temperatur in-
kubiert, dann bei 4°C gegen 2 x SSC dialysiert und anschließend
8 Stunden gegen 500 ml Pufferlösung, die 0,1 M Phosphat, 1 M
NaCl und 0,01 M Äthylendiamintetraessigsäures Natrium (EDTA) enthält,
25 bei einem ph-Wert von 7,0 dialysiert. Letztere Dialyse wird
zweimal wiederholt und je 8 Stunden durchgeführt. Die erhalte-
ne Lösung wird eine Stunde bei üblicher Temperatur mit pank-
reatischer Ribonuclease inkubiert. Die Ribonuclease-Konzen-
tration beträgt 10 µg/ml. Durch diese Behandlung kann nicht
30 hybridisierte RNA abgebaut werden.
Sodann werden 1 mg/ml Cytochrom C-Lösung und 1 µl einer Lösung,
die in 1 mg/ml Avidin und 2 mg/ml β-Galactosidase enthält, zu-
gegeben. Dabei erweist sich, daß eines von 7 Molekülen β-Ga-
lactosidase an Avidin gebunden ist. Die Lösung wird gerührt
35 und sodann 4 Stunden bei 4°C stehengelassen.
Anschließend wird mit Phosphat-Dialysepuffer auf 10 ml ver-
dünnt, und die erhaltene Lösung wird eine Stunde bei 35 000

1 U/Min. zentrifugiert (im Beckman Rotor SW 41). DNA- und RNA-Hybride finden sich im Niederschlag zusammen mit den an diese RNA gebundenen Avidin- β -Galactosidase-Komplexen. Der Überstand enthält nicht hybridisierte und durch Ribonuclease abgebauten RNA sowie
5 ungebundene Avidin und β -Galactosidase.

Der Niederschlag wird abgetrennt und erneut in 10 ml Pufferlösung suspendiert und zentrifugiert. Anschließend wird der Niederschlag in 0,5 ml Puffer aufgenommen (Tube Nr. 1). Sodann wird die Aktivität der β -Galactosidase beim Umsetzen des Substrats
10 ONPG nach der Methode von Miller (Experiments in bacterial genetics (1972), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA) durch Messung der optischen Dichte der Lösung bei 420 μ m bestimmt, und zwar nach mindestens 30-minütiger Inkubation bei 37°C. Es werden unter genauer Einhaltung
15 der vorgenannten Bedingungen Kontrollproben hergestellt, wobei jedoch beim ersten Kontrollversuch die Zugabe der ribosomalen RNA (Tube Nr. 2) und beim zweiten Kontrollversuch die Zugabe der Maus-DNA (Tube Nr. 3) weggelassen wird. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefaßt.

20

Tabelle

Tube Nr.	Inhalt		optische Dichte bei 420 μ m, nach 30 Min., bei 37°C
	DNA	RNA	
25			
1	+	*	0,45
2	+	-	0,14
3	-	+	0,15

30

* + und - in der DNA- und RNA-Spalte deuten jeweils an, ob die DNA bzw. RNA in der ursprünglichen Lösung vorhanden war oder nicht.

35 Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die in der (das Hybrid enthaltenden) Tube Nr. 1 gemessene optische Dichte signifikant höher ist als bei den Kontrollproben.

- 1 Das Versuchsbeispiel erläutert also die Bedingungen, unter denen die gegebenenfalls anwesende DNA bzw. das DNA-Fragment nachgewiesen werden kann, sofern ein komplementärer Indikator dieser DNA bzw. des DNA-Fragments verfügbar ist, und zwar
- 5 durch eine einfache Methode, die weder kompliziertes Labormaterial noch besonders große fachmännische Erfahrung erfordert.

- Das erfindungsgemäße Verfahren kann bei diagnostischen in vitro-Verfahren zum Nachweis verschiedener Viren, wie Herpes,
- 10 Epstein Barr, Pox-Virus, Cytomegalo, in biologischen Proben (wie Blutproben, Stuhlproben) besonders vorteilhaft angewandt werden. Es kann ferner für die Diagnose bestimmter chromosomal Anomalien angewandt werden.
 - 15 Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiterhin zur Feststellung der bakteriellen Diagnose, insbesondere bei Trägern pathogener Gene, seien sic exprimiert, nicht exprimiert oder latent , angewandt werden.
 - 20 Für den Fachmann liegt es auf der Hand, daß man beim Suchen einer infektiösen DNA rasch auf den Erkrankungsgrad einer erfindungsgemäß behandelten biologischen Probe im Hinblick auf die gesuchte Nukleinsäure bzw. deren Fragmente schließen kann, wenn keine Induzierung oder zumindest keine Überschreitung der
 - 25 Aktivitätsschwelle auf dem farbigen Substrat festgestellt wird, sei es durch Versuche sei es durch Vergleich mit den virusfreien Kontrollproben.
- Umgekehrt kann die festgestellte nicht vorhandene Aktivität
- 30 hinsichtlich des farbigen Substrats, insbesonder oberhalb der vorgenannten Schwelle, in einem anderen bereits angesprochenen Bereich Anwendung finden: Sie kann die Anwesenheit einer Anomalie gesuchter chromosomal Abnormalität durch die festgestellte nicht vorhandene gesamte oder partielle Hybridisierung zwischen
 - 35 Indikator und untersuchter DNA anzeigen.

Beispielsweise kann man für medizinische Labors

1 Reagensätze ("Kit") mit allen zur Durchführung des erfundungsgemäßen Verfahrens notwendigen Reagentien zur Verfügung stellen. Solche Reagensätze können insbesondere Muster für Indikatoren enthalten, die beispielsweise den DNA von 5 gut erforschten pathogenen Viren oder Bakterien entsprechen, und sogar für Indikatoren, die den besonderen Genen entsprechen, die normalerweise in biologischen zu untersuchenden Proben wie Blut enthalten sind.

10 Wie bereits erwähnt, sollte der modifizierte Indikator vorzugsweise ein Indikator sein, an den Biotin gebunden ist und wobei das modifizierte Enzym, beispielsweise die β -Galactosidase, selbst an das Avidin gebunden ist.

15 Die Erfindung betrifft weiterhin neue Komplexe aus einem Enzym (dessen Aktivität im Hinblick auf insbesondere ein farbiges Substrat nachgewiesen werden kann) und einem Indikator (RNA oder einzelsträngige DNA), sei es die Bindung erfolgt direkt, sei es mit Hilfe eines komplexbildenden Mittels 20 zur industriellen Verwendung. Sie betrifft auch den Komplex aus Enzym und mindestens einem chemischen Molekül, wobei der ganze Komplex an einen gegebenenfalls modifizierten Indikator (RNA oder DNA) gebunden werden kann, der selbst mit einer DNA bzw. einem DNA-Fragment hybridisierbar ist. Solche neuen industrielle Produkte sind bei- 25 spielsweise die Komplexe aus Indikator (RNA oder DNA) und einem Enzym, wie die β -Galactosidase, oder die Komplexe aus Avidin bzw. Biotin und einem solchen Enzym.

Die Erfindung kann noch in anderen Bereichen Anwendung finden, 30 insbesondere bei der Markierung bestimmter DNA-Fragmente in bekannten genetischen Versuchen zur Bestimmung des Genotyps der in Frage stehenden DNA. Sie kann insbesondere Anwendung finden bei der Bestimmung, ob ein besonderes DNA-Fragment in genetischen Ausleseversuchen inkorporiert ist oder nicht. Bei 35 diesen Ausleseversuchen geht es beispielsweise um Transformationen von Zellen mittels fremder DNA, die das betreffende DNA-Fragment enthält, oder aber um Transduktionsversuche, bei denen

1 DNA-Fragmente, die normalerweise in der zellulären DNA ent-
halten sind, in die virale DNA übergehen, mit der die Zellen
infiziert worden sind. Eine solche Anwendung ist natürlich nur
möglich, wenn man über einen Indikator verfügt, der das kom-
5 plementäre RNA- bzw. DNA-Fragment des Fragments der gesuchten
Nukleinsäure ist.

Die vorliegende Erfindung erschöpft sich keineswegs in den er-
läuterten Anwendungs- und Durchführsmöglichkeiten. Sie um-
10 faßt vielmehr alle Varianten, insbesondere hinsichtlich Modi-
fizierungen des Indikators, die eine enzymatische Dosierung
des Hybrids ermöglichen, sowie die Modifizierungen hinsichtlich
der Bildung und/oder Reinigung des Hybrids, der Markierung oder
chemischen Modifizierung der untersuchten DNA selbst, und zwar
15 unter den vorgenannten Bedingungen, wobei beim RNA-Indikator
keine besondere Markierung vorgenommen wird. Eine Umkehrung der
Reagentien kann beispielsweise im Falle einer DNA in Betracht
gezogen werden, die zahlreiche repetitive Gene enthält, welche
aus der gesamten DNA in Form des Hybrids mit dem Indikator iso-
20 liert werden sollen. Vorher wird die DNA durch übliche Methoden
fragmentiert.

25

Gemäß einer anderen Ausführungsform kann man das Verfahren zum
Nachweis des Hybrids aus der gesuchten DNA und dem Indikator,
mittels eines an ein Enzym, beispielsweise die β -Galactosi-
dase, gebundenen Antihybrid-Antikörpers anwenden.

30

35